文章编号:1000-5404(2008)19-1799-04

论著

# 白血病细胞雌激素受体多个启动子甲基化的实验研究

姚 婕,张晓兵,王 珏,府伟灵 (第三军医大学西南医院检验科,重庆 400038)

**摘 要:目的** 检测白血病细胞雌激素受体(estrogen receptors, ER)基因启动子区CpG岛甲基化状态情况,探讨雌激素受体基因多个启动子区包括ERα (ERα-A, -B and -C)和ERβ甲基化与其表达异常的联系。**方法** 应用RT-PCR检测6种白血病细胞株以5′-杂氮-2-脱氧胞苷(5′-Aza-Dc)去甲基化前后ER基因表达活性并应用甲基化特异性PCR技术(methylation specific PCR, MSP)检测10例正常人白细胞和6种白血病细胞株以5′-Aza-Dc去甲基化前后ER基因甲基化状态。**结果** ER各启动子在白血病细胞株中均出现甲基化或半甲基化带,但只有ERα-A基因表达沉默而且在正常人白细胞中呈未甲基化状态,在以5′-Aza-Dc处理细胞株后ERα-A基因表达恢复。**结论** 白血病细胞的雌激素受体基因启动子区存在高甲基化现象并导致其基因表达沉默,可能为白血病的致病机制分析提供了一个新的方向,提示ERα-A基因启动子CPG岛的甲基化有可能成为白血病的新的参考标记物。

**关键词**:白血病;雌激素受体基因;DNA甲基化;启动子
**中图法分类号**:R329.26; R730.23; R733.7 **文献标识码**:A

# Methylation profile of estrogen receptor promoters gene in leukemia cells

YAO Jie, ZHANG Xiao-bing, WANG Jue, FU Wei-ling (Department of Laboratory Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: Objective To investigate the methylation status of promoter CpG islands of the estrogen receptors (ERs) in leukemia cell lines, including 3 promoters of ERα (ERα-A, -B and -C) and one promoter of ERβ, and explore the possible relationship between the mRNA expressions of the promoters and the CpG methylation. Methods With RT-PCR and methylation specific PCR (MSP), the mRNA expressions of above promoters and their status of methylation in leukemia cell lines HL-60, K562, Jurkat, THP-1, U937 and MOLT-410, and health controls with or without treatment of 5-AzA-2′-Deoxycitidine (5-Aza-DC). Results Promoters of ER were all methylated or semi-methylated in the 6 strains of leukemia cells. Only the ERα-A was inactivated in these leukemia cell lines and was unmethylated in all 10 health controls, and the expression was recovered after the treatment of 5′-Aza-DC. Conclusion The CpG islands of ER promoter are hypermethylated in 6 strains of leukemia cells, and this inactivate the expression of ERα-A, which can be activated by the treatment of 5′-Aza-DC.

**Key words**: leukemia; estrogen receptor; DNA methylation; promoter

性激素受体是类固醇受体之一,通过信号传递途径调控细胞的增殖分化,随着DNA甲基化与肿瘤关系的深入研究发现白血病细胞存在多种基因启动子高甲基化,如雄激素受体(AR)。作为功能性ER,其基因有两个亚型(ERα和ERβ),其表达受4个启动子调控,ERα包括3个启动子(ERα-A,-B,-C)[1]。为探讨白血病细胞中ER基因mRNA表达异常与其基因甲基化状态的关系,以白血病细胞HL-60、K562、Jurkat、THP-1、U937和MOLT-4为样本,观察了以5′-杂氮-2′-脱氧胞苷(5′-Aza-Dc)对白血病细胞株脱甲基化前后的ER基因甲基化状态及ER mRNA的表达情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养与5′-Aza-Dc处理白血病细胞株

HL-60、K562、Jurkat、THP-1、U937和MOLT-4细胞在RPMI1640培养液10%胎牛血清、5% $CO_2$、37 ℃条件下培养,取对数生长期细胞,用终浓度为2 μmol/L的5′-Aza-Dc (Sigma公司产品)处理,24 h后弃去重新更换新鲜培养基培养1 d,于第3天和第5天用2倍于第1天的5′-Aza-Dc处理细胞,第6天换成培养基继续培养1天后收获细胞。

### 1.2 RNA的提取和RT-PCR

以RNA Extraction Kit for Culture Cells (TaKaRa, Dalian, China)提取白血病细胞株总RNA。3个正向引物RT-A, RT-B

基金项目:国家自然科学基金(30600264);重庆市自然科学基金(2006BB5382)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30600264) and the Natural Science Foundation of Chongqing (2006BB5382)
作者简介:姚 婕,女,四川省安岳县人,博士研究生,实验师,主要从事DNA甲基化方面的研究。电话:(023)65460801
通信作者:府伟灵,电话:(023)68754429,E-mail:weilingfu@yahoo.com
王 珏,电话:(023)68754853
收稿日期:2008-06-26;修回日期:2008-07-30

**表1 ER各PCR反应引物及反应条件**

| 引物 | 序列（5′→3′） | 变性温度 | 退火温度 | 延伸引温度 | 循环数 |
|---|---|---|---|---|---|
| ERα-C-Uf | TTTTATATTTTTTGGGATTGT | 94 ℃, 30 s | 46 ℃, 30 s | 72 ℃, 60 s | 40 |
| ERα-C-Ur | AAAAACTCAAAAACCAACA | | | | |
| ERα-C-Mf | TTTTATATTTTTCGGGATTGC | 94 ℃, 30 s | 49 ℃, 45 s | 72 ℃, 60 s | 40 |
| ERα-C-Mr | AAAAACTCAAAAACCGGCG | | | | |
| ERβ-Uf | TTTGGAAGGTGGGTTTGGTT | 94 ℃, 30 s | 46 ℃, 30 s | 72 ℃, 60 s | 40 |
| ERβ-Ur | CACATACAAATATAATAACTAACA | | | | – |
| ERβ-Mf | TTTGGAAGGTGGGTTTGGTC | 94 ℃, 30 s | 49 ℃, 45 s | 72 ℃, 60 s | 40 |
| ERβ-Mr | CGCATACAAATATAATAACTAACG | | | | |
| RT-Cf | GCACAGCACTTCTTGAAAAAGG | 94 ℃, 30 s | 59 ℃, 45 s | 72 ℃, 60 s | 40 |
| RT-Bf | CACATGCGAGCACATTCCTTCC | 94 ℃, 30 s | 61 ℃, 45 s | 72 ℃, 60 s | 40 |
| RT-Af | CCTCGGGCTGTGCTCTTTTTCC | 94 ℃, 30 s | 62 ℃, 45 s | 72 ℃, 60 s | 40 |
| RT-ABCr | AGGGTCATGGTCATGGTCCG | | | | |
| RT-Common-f | ACGACTATATGTCCAGCC | 94 ℃, 30 s | 62 ℃, 45 s | 72 ℃, 60s | 40 |
| RT-Common-r | AGGTTGGCAGCTCTCATGTCTCC | | | | |
| RT-ERβ-f | CTTGGAAGGTGGGCCTGGTC | 94 ℃, 30 s | 59 ℃, 30 s | 72 ℃, 60 s | 40 |
| RT-ERβ-r | CGCATACAGATGTGATAACTGGCG | | | | |
| β-Actin-f | AAGGCCAACCGCGAGAAGAT | 94 ℃, 30 s | 52 ℃, 30 s | 72 ℃, 60 s | 40 |
| β-Actin-r | TCGGTGAGGATCTTCATGAG | | | | |

和RT-C,共用一个公共反相引物RT-r以扩增ERα3个亚型A、B和C。RT-ERβ-f和RT-ERβ-r用以扩增ERβ，β-Actin引物被设计跨过β-Actin基因的一个内含子(引物均由上海生工生物技术服务有限公司合成)。反应产物在20 g/L的琼脂糖凝胶上电泳，在紫外灯下观察结果,引物序列及PCR反应条件见表1。

### 1.3 DNA提取和重亚硫酸氢盐处理

以QIAamp DNA Blood Mini Kit（Qiagen, Valencia, CA, USA)提取白血病细胞株基因组DNA。重亚硫酸氢盐处理:以EZ DNA Methylation kit（Zymo Research, USA)对基因组DNA进行修饰。修饰后的DNA溶解于20 μl的M-Elution Buffer, –20 ℃保存。

### 1.4 甲基化特异性PCR(MSP)

设计3对引物(U、M和W)引物均由上海生工生物技术服务有限公司合成。修饰过的DNA用引物M（Methylation,甲基化)和U（Unmethylation,未甲基化）扩增,未修饰DNA用引物W（Wild,野生型)进行扩增。25 μl PCR反应体系为：5 pmol引物，1.0 μl of 重亚硫酸盐修饰后DNA溶解于M-Elution Buffer, 和 *ExTaq* HS DNA Polymerase kit（TaKaRa)（包括0.625单位 *ExTaq* HS DNA Polymerase, 1 × *ExTaq* Buffer [$Mg^{2+}$ plus], and 250 μmol/L dNTP)。反应产物在20 g/L的琼脂糖凝胶上电泳,在紫外灯下观察结果,引物序列及PCR反应条件见表1。

### 1.5 测序

为验证MSP检测结果,将上述PCR扩增的产物直接送上海生工生物技术服务有限公司测序并将结果与GenBank序列进行对比分析。

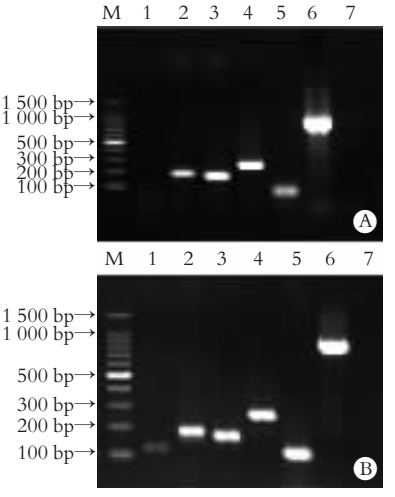
## 2 结果

### 2.1 白血病细胞株去甲基化前后ER基因启动子mRNA表达分析

以RT-PCR检测6株白血病细胞株5′-Aza-Dc去甲基化前后ERα三个亚型(ERα-A, -B, -C)和ERβ的mRNA表达活性。ERα-A, -B, -C, 和ERα在所有细胞株去甲基化前后mRNA表达都有差异,但只有ERα-A在6株白血病细胞株去甲基化前表达缺失,而在去甲基化后表达恢复。

### 2.2 白血病细胞株去甲基化前后ER基因启动子甲基化状态分析

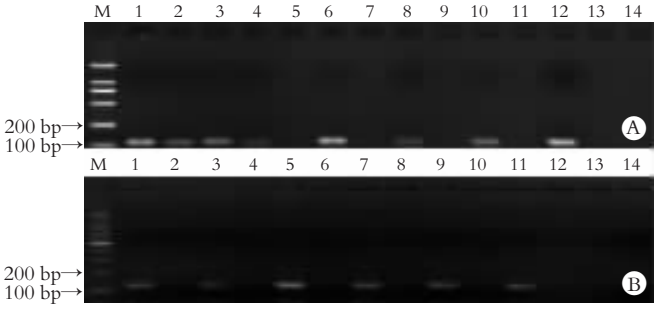
以MSP检测6株白血病细胞株5′-Aza-Dc去甲基化前后ERα三个亚型(ERα-A, -B, -C)和ERβ的甲基化状态。ER在6株白血病细胞株中都呈甲基化状态,Jurkat细胞和K562细胞呈半甲基化状态,6株白血病细胞株以5′-Aza-Dc去甲基化后ER启动子全为未甲基化状态。见图1、2。




M: 100 bp DNA ladders (TaKaRa); 1、2、3、4、5、6、7分别为ERα-A, -B, -C,ERα 阳性对照,ERβ,β-actin 和空白对照。ERα-A (110 bp), -B (187 bp), -C (167 bp), ERα 阳性对照(252 bp), β-Actin (876 bp)

A: 去甲基化前白血病细胞株(Jurkat)ER表达活性; B: 去甲基化后白血病细胞株(Jurkat)ER表达活性

**图1 白血病细胞株(Jurkat)在5′-Aza-Dc处理前后的ER表达活性**




M: 100 bp DNA ladders (TaKaRa); 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 和 14 分别代表 Jurkat 细胞 USP, Jurkat 细胞 MSP, K562 细胞 USP, K562 细胞 MSP, HL-60 细胞 USP, HL-60 细胞 MSP, THP-1 细胞 USP, THP-1 细胞 MSP, U-937 细胞 USP, U-937 细胞 MSP, MOLT-4 细胞 USP, MOLT-4 细胞 MSP, USP 阴性对照和 MSP 阴性对照
A:去甲基化前 ER 启动子甲基化状态;B:去甲基化后 ER 启动子甲基化状态

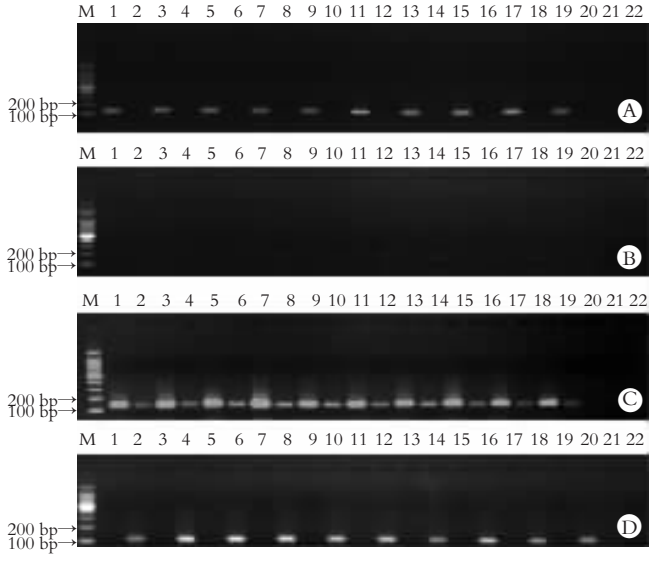
**图 2　ERα-A 启动子在白血病细胞株中以 5′-Aza-Dc 处理前后的甲基化状态**

### 2.3　10 例正常人白细胞 ER 基因启动子甲基化状态分析

从图 3 可以看出在 10 例正常人白细胞中只有 ERα-A 全部呈未甲基化状态,ERα-B 全部呈甲基化状态,ERα-C 全部呈半甲基化状态,ERβ 也全部呈甲基化状态。

### 2.4　测序结果

MSP 反应中 M、U 引物扩增的 PCR 产物部分测序,经过与 GenBank 中 ER 基因启动子基因相应序列对比可看出,重亚硫酸盐修饰后的 DNA 中,发生甲基化的胞嘧啶(C)保持不变,而未甲基化的胞嘧啶(C)却经脱氨基作用转化为胸腺嘧啶(T)。




A,B,C 和 D 分别为 ERα-A、ERα-B、ERα-C 启动子和 ERβ 在 10 例正常人白细胞中甲基化状态。条带 1 和 2 分别表示第 1 个正常人白细胞 USP 和 MSP,以此类推。条带 21 和 22 分别表示 USP 和 MSP 的阴性对照

**图 3　ERα(-A,-B,-C)和 ER β 启动子在 10 例正常人白细胞中甲基化状态**

## 3　讨论

ER 属于甾体激素核受体超家族成员,基因定位于 6 号染色体的 6q25.1 区,由 595 个氨基酸构成,由 8 个外显子和 7 个内含子组成。ERα 基因启动子区域包含多个启动子而 ERβ 基因启动子区域只有 1 个启动子[1,2],启动子区域富含 CpG 岛,主要参与多种组织细胞的增殖、分化和发育。

肿瘤表观遗传学研究表明肿瘤发生和发展与肿瘤中的某些基因的启动子 CpG 岛甲基化状态变化密切相关,主要是通过一些组织特异性表达基因 CpG 岛甲基化变化调控其基因的表达,而肿瘤的异常甲基化能导致受累基因表达沉默或减弱,从而失去对正常细胞的调控,导致细胞的恶性增殖[5]。有研究表明 ER 基因启动子在白血病细胞中有特异性甲基化现象[10]。本课题组前期对 ERα 基因 A 和 B 启动子区域在白血病细胞中的甲基化状态进行了初步的实验,发现 ERα 基因 A 和 B 启动子区域在白血病细胞中均呈甲基化状态[11]。我们进一步对 ER 基因的两个亚型(ERα 和 ERβ)的四个启动子在白血病中的表达异常与甲基化的关系进行研究。

本实验在运用 RT-PCR 和 MSP 技术分析白血病细胞 ERα ( ERα-A、-B 和-C)和 ERβ 基因表达与基因启动子 CpG 岛甲基化状态的关系,发现白血病细胞株 Jurkat, HL-60, K562, U937, THP-1, 和 Molt-4 中 ERα-A、B 和 C 为完全甲基化或半甲基化状态,但只有 ERα-A 基因表达缺失,再以 5′-Aza-Dc 去甲基化,在所有细胞株中 ERα-A 表达恢复而其他几个启动子表达在去甲基化前后无明显差异,ERα ( ERα-A、-B 和-C)和 ERβ 启动子发生脱甲基化,处于非甲基化状态。并且 ERα-A 启动子在 10 例正常人白细胞中全部呈未甲基化状态,这也许提示雌激素受体家族的 ERα-A 启动子 CpG 岛甲基化状态的改变可能与白血病的发生机制、发展与预后存在一定的联系。在白血病中, ERα-A 启动子的高甲基化导致基因表达“沉寂”。DNA 甲基化与 DNA 甲基转移酶有关, 5′-Aza-Dc 具有降低 DNMT1 表达的能力,从而引起 DNA 脱甲基化。ERα-A 基因启动子 CpG 岛出现高甲基化现象,为白血病的致病机制分析和内分泌药物治疗提供了一个新的方向,同时提示 ERα-A 启动子 CpG 岛的异常甲基化状态,有可能成为临床检测白血病一个新的分子生物学上的诊断标志。

**参考文献:**

[1] Liu Z J, Zhang X B, Zhang Y, *et al*. Progesterone receptor gene inac-

tivation and CPG island hypermethylation in human leukemia cancer cells[J]. FEBS Lett, 2004, 567(2-3): 327-332.
[2] Chang H G, Kim S J, Chung K W, *et al*. Tamoxifen-resistant breast cancers show less frequent methylation of the estrogen receptor beta but not the estrogen receptor alpha gene[J]. J Mol Med, 2005, 83(2): 132-139.
[3] Rody A, Holtrich U, Solbach C, *et al*. Methylation of estrogen receptor beta promoter correlates with loss of ER-Beta expression in mammary carcinoma and is an early indication marker in premalignant lesions [J]. Endocr Related Cancer, 2005,12(4): 903-916.
[4] Li L C, Chui R, Nakajima K, *et al*. Frequent methylation of estrogen receptor in prostate cancer: correlation with tumor progression[J]. Cancer Res, 2000, 60(3): 702-706.
[5] Liu Z J, Maekawa M, Horii T, *et al*. The multiple promoter methylation profile of PR gene and ERalpha gene in tumor cell lines[J]. Life Sci, 2003, 73(15): 1963-1972.
[6] Sasaki M, Kaneuchi M, Fujimoto S, *et al*. Hypermethylation can selectively silence multiple promoters of steroid receptors in cancers [J]. Mol Cell Endocrinol, 2003, 202(1-2): 201-207.
[7] Mori T, Martinez S R, O'Day S J, *et al*. Estrogen receptor-Alpha methylation predicts melanoma progression[J]. Cancer Res, 2006, 66 (13): 6692-6698.
[8] Giacinti L, Claudio P P, Lopez M, *et al*. Epigenetic information and estrogen receptor alpha expression in breast cancer[J]. Oncologist, 2006, 11(1): 1-8.
[9] Sasaki M, Kotcherguina L, Dharia A, *et al*. Cytosine-phosphoguanine methylation of estrogen receptors in endometrial cancer[J]. Cancer Res, 2001, 61(8): 3262-3266.
[10] Melki J R, Vincent P C, Clark S J. Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia[J]. Cancer Res, 1999, 59(15): 3730-3740.

（编辑 栾 嘉）

# 个案与短篇

文章编号:1000-5404(2008)19-1802-01

## 超声波对正常皮肤作用的组织学观察

黄 宏[1],朱方强[2],许 川[1],王丽丽[1],赖西南[1] （[1]第三军医大学大坪医院野战外科研究所第六研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,[2]泌尿外科,重庆 400042）

尽早实施彻底清创是防止或减少创伤后感染和死亡发生的关键。20世纪80年代以来,国内外已有研制和应用超声波射流冲洗系统的报告,即利用超声波的"空化"效应产生强大的机械力将创面上的细菌、污染物、破碎的坏死组织剥离下来,达到有效地清洗创面的目的;而超声波也能引起生物组织损伤效应,其损伤程度与频率和功率有关[1]。本实验应用通过不同功率的超声波定点作用于正常皮肤及深层组织,观察其引起的损伤效应,以评价我们设计的超声波射流冲洗系统的安全性。

### 1 材料与方法

新西兰大白兔2只,购自我院实验动物中心,3.5 kg,兔龄16周。用毛剪进行背部及腿部脱毛,并用记号笔标记出超声波作用点,冲洗时出水头应尽量接近皮肤(距皮肤约1 mm)而不接触皮肤,冲洗的皮肤范围直径约0.5 cm大小。我们所设计的超声波射流冲洗系统的探头直径约0.5 cm,能输出3种不同大小功率超声波,采用高功率超声波、中等功率超声波、低功率超声波分别进行皮肤定点冲洗不同部位20、40、60 s后,立即取材,取材包括全层皮肤和1 cm厚的肌肉组织。用10%的甲醛固定,HE染色。光镜下观察皮肤、肌肉组织的病理学改变。

**基金项目**:全军医药卫生科研基金面上课题(98M037)
Supported by the General Program of the Scientific Research Foundation for Medical Science and Public Health of PLA (98M037)
**作者简介**:黄 宏,女,重庆市人,博士,副研究员,主要从事创伤愈合与组织修复方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68757460,E-mail: huanghongcq@hotmail.com
**收稿日期**:2008-04-09;**修回日期**:2008-07-14

### 2 结果

#### 2.1 正常兔皮肤、肌肉组织

表皮连续,上皮细胞层数较少,为3~4层。真皮层为非常致密的结缔组织,只有密集的、成束状红染的胶原纤维,排列均匀、规则。皮下组织层很薄,为纤细疏松的结缔组织,血管丰富。再深层为肌肉组织,肌细胞膜完整,肌浆内肌原纤维排列整齐。

#### 2.2 低频率超声波冲洗

大体病理变化:应用低频率超声波冲洗20、40、60 s后,肉眼观察皮肤表面无任何改变。显微镜下观察:冲洗20、40、60 s后,对皮肤、皮下组织以及深层肌肉均没有损伤性改变。

#### 2.3 中等频率超声波冲洗

大体病理变化:20 s和40 s后皮肤无任何异常,仅在冲洗60 s后,局部皮肤表面轻微发红。显微镜下观察:冲洗20、40 s后,仅见皮下小血管轻微充血(+)。冲洗60 s后,皮下小血管充血即中度充血(++),表皮与真皮出现分离,其胶原束排列变得疏松。但表皮是连续的,无缺损,真皮出现损伤性改变。深层肌肉没有损伤性改变。

#### 2.4 高频率超声波冲洗

大体病理变化:冲洗20 s与正常皮肤无差异;但冲洗40、60 s后,局部皮肤表面有轻微发红,肿胀。显微镜下观察:冲洗20 s后,表皮出现不连续的缺损区域出血明显(+++),可见白细胞滞留于小血管;也可见皮肤肿胀,表现为局部高出皮肤,皮下致密结缔组织变得疏松,胶原束断裂呈点片状。深层肌肉均没有损伤性改变;冲洗40 s后,表皮崩解,表皮缺损区域较冲

（下转1806页）